

AUTORI

A. Pino^{1,2}
A.M.C. Rapisarda^{2,3}
C. Caggia^{1,2}
A. Cianci²
C.L. Randazzo^{1,2}
L. Morelli⁴

¹Dipartimento di
Agricoltura, Alimentazione
e Ambiente, Università degli
Studi di Catania, Italia

²ProBioEtna, spinoff
dell'Università degli Studi di
Catania, Italia

³Dipartimento
di Chirurgia Generale
e Specialità medico-
Chirurgiche, Università degli
Studi di Catania, Italia

⁴Business Unit Health
& Nutrition di SACCO,
Cadorago (CO)

✉cinzia.randazzo@unict.it

Lacticaseibacillus rhamnosus CA15 (DSM 33960) alleato per la salute riproduttiva della donna

Caratterizzazione preclinica e studio clinico randomizzato

ABSTRACT

Lacticaseibacillus rhamnosus CA15 (DSM 33960): a probiotic strain able to support the women wellbeing

Preclinical and clinical studies

Lactobacilli play a key role in maintaining a balanced vaginal microbiota and their administration has been suggested for the treatment and prevention of vaginal dysbiosis. The present study aimed to *in vitro* and *in vivo* evaluate the probiotic features of the *Lacticaseibacillus rhamnosus* CA15 strain (DSM 33960), isolated from the vaginal ecosystem of a healthy woman. The CA15* strain was tested for both safety (haemolytic activity, mucin degradation capacity, production of DNase and gelatinase, antibiotic resistance) and functional potential (antimicrobial activity against pathogens; ability to produce hydrogen peroxide, organic acids and lactic acid; antioxidant and anti-inflammatory activity; ability to produce biofilm, to adhere to intestinal mucus and to both intestinal and vaginal human cell lines; production of exopolysaccharides; ability to survive during gastrointestinal digestion).

In addition, a double-blind randomized controlled clinical study was planned. Both preclinical and clinical data support the suitability of the *L. rhamnosus* CA15 (DSM 33960) probiotic strain, orally administered, to restore the homeostasis of the vaginal microbiota significantly reducing clinical signs and symptoms and improving the quality of life of women under reproductive age.

PAROLE CHIAVE

Microbiota vaginale
Probiotici
Performance funzionali
Studio clinico

*CA15 è prodotto e distribuito da Sacco System (Cadorago, CO). www.saccosystem.com.

RIASSUNTO

I lattobacilli giocano un ruolo chiave nel mantenimento della condizione di omeostasi del microbiota vaginale e il loro utilizzo risulta promettente nel trattamento e nella prevenzione dell'insorgenza delle disbiosi. Il presente studio ha avuto lo scopo di valutare in vitro e in vivo le performance probiotiche del ceppo *Lacticaseibacillus rhamnosus* CA15 (DSM 33960), isolato dall'ecosistema vaginale di una donna sana. A tale scopo, il ceppo CA15* è stato testato sia per le caratteristiche di sicurezza (attività emolitica, capacità di degradazione della mucina, capacità di produrre DNase e gelatinasi e l'antibiotico-resistenza) sia per le potenzialità probiotiche (attività antimicrobica nei confronti di svariati patogeni; capacità di produrre perossido di idrogeno, acidi organici e acido lattico; attività antiossidante e antinfiammatoria; capacità di produrre biofilm, di aderire al muco intestinale e a linee cellulari umane sia intestinali sia vaginali; produzione di esopolisaccaridi; capacità di sopravvivere durante digestione gastrointestinale). La capacità del CA15 di ricostituire la condizione di omeostasi del microbiota vaginale è stata valutata mediante l'esecuzione di uno studio clinico randomizzato controllato in doppio cieco. I dati sia preclinici sia clinici supportano l'idoneità del ceppo probiotico *L. rhamnosus* CA15 (DSM 33960), somministrato per via orale, nel ripristinare l'omeostasi del microbiota vaginale e, di conseguenza, ridurre significativamente i segni e i sintomi clinici, migliorando la qualità della vita delle donne in età riproduttiva.

Introduzione

Il microbiota vaginale si configura come una comunità di microrganismi, sia aerobi sia anaerobi, in equilibrio tra loro, rappresentando una difesa nei confronti dei batteri patogeni. In condizioni di eubiosi i lattobacilli rappresentano le specie predominanti e la loro riduzione/deplezione è associata all'insorgenza di stati di disbiosi, quali la vaginosi batterica (BV), la candidosi vulvovaginale (VVC), e di condizioni patologiche, quali le infezioni a trasmissione sessuale (IST), la tricomiasi, l'infezione da papillomavirus, l'infezione da *Chlamydia trachomatis*, la suscettibilità all'HIV e l'infezione da herpes genitale (1). Sebbene gli antibiotici e gli antimicotici siano tradizionalmente usati per trattare gli stati di disbiosi, numerosi effetti collaterali, quali le recidive a breve termine e la promozione della resistenza agli antibiotici, sono frequentemente riportati. Recentemente, infatti, il crescente fenomeno della farmaco-resistenza e il fallimento delle terapie antibiotiche convenzionali hanno stimolato la comunità scientifica a rivolgere l'attenzione verso terapie alternative al fine di ricostituire la condizione di omeostasi del microbiota vaginale. In questo contesto, l'integrazione di microrganismi probiotici, anche eventualmente in associazione alla

terapia antibiotica, è tra le soluzioni che hanno ottenuto più consensi (2,3). Infatti, i dati emersi dalla ricerca pre-clinica avvalorano l'ipotesi secondo cui i probiotici, attraverso meccanismi d'azione di tipo multifattoriale, quali l'immunomodulazione, la produzione di composti antimicrobici e la competizione per nutrienti e per i siti di adesione, siano in grado di ripristinare l'omeostasi del microbiota vaginale (4,5). Recenti studi suggeriscono che i ceppi probiotici ascritti al genere *Lactobacillus* sono particolarmente idonei alla ricostituzione della condizione di omeostasi del microbiota vaginale attraverso differenti meccanismi d'azione, che comprendono per lo più la riduzione del pH vaginale, la prevenzione dell'adesione dei patogeni, la produzione di sostanze ad azione immunomodulante e antimicrobica, l'azione sinergica con il sistema immunitario dell'ospite (6). Sebbene diversi ceppi microbi siano stati caratterizzati per le performance probiotiche, solo pochi sono stati valutati in vivo, quali sostituti degli antimicrobici convenzionali. In aggiunta, solo pochissimi ceppi probiotici sono stati validati nella somministrazione orale, dimostrando la capacità di traslocare dall'intestino alla vagina. Nel presente articolo presentiamo i dati relativi al ceppo probiotico CA15, ascritto alla specie *Lacticaseibacillus rhamnosus*, caratterizzato in vitro e in vivo per le proprie performance funzionali.

Materiali e Metodi

Genesi e valutazione in vitro delle performance funzionali

Il ceppo *Lacticaseibacillus rhamnosus* CA15 è stato isolato dall'ecosistema vaginale di una donna sana in età riproduttiva. Previa caratterizzazione fenotipica e sequenziamento dell'intero genoma, il ceppo è stato depositato presso la collezione internazionale Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con numero di deposito DSM 33960. Il ceppo CA15 è stato sottoposto a valutazione dei requisiti di sicurezza e in accordo con quanto riportato nelle linee guida per probiotici e prebiotici, redatte dal Ministero della Salute presso i laboratori di PROBIOETNA, uno spin-off dell'Università degli Studi di Catania che offre una piattaforma di ceppi probiotici prontamente scalabili a livello industriale, con dossier validati da studi preclinici e clinici e calibrati su specifici target di popolazione.

In dettaglio, sono state studiate: l'attività emolitica, la capacità di degradazione della mucina, la capacità di produrre DNase e gelatinasi nonché l'antibiotico resistenza nei confronti di svariati antibiotici di cui l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha stabilito i valori di breakpoint. In merito alle performance funzionali, il ceppo CA15 è stato testato per l'attività antimicrobica nei confronti di svariati patogeni; la capacità di produrre perossido di idrogeno, acidi organici e acido lattico; l'attività antiossidante e antinfiammatoria; la capacità di produrre biofilm, di aderire al muco intestinale e a linee cellulari umane sia intestinali sia vaginali; la produzione di esopolisaccaridi; la capacità di sopravvivere durante digestione gastrointestinale (7).

Studio clinico

Al fine di validare in vivo le evidenze precliniche, è stato condotto uno studio randomizzato controllato in doppio cieco volto a valutare l'efficacia del CA15, somministrato per via orale, nel trattamento delle disbiosi vaginali. In dettaglio, presso la Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Vittorio Emanuele del Presidio Gaspare Rodolico di

Catania, 60 donne sane in età riproduttiva (19–45 anni) con segni e sintomi riconducibili a disbiosi vaginale, confermata da analisi cliniche e microbiologiche, sono state reclutate e randomizzate in 2 gruppi, Active (n = 40) e Placebo (n = 20). Le donne assegnate al gruppo Active hanno assunto per via orale 1 capsula contenente 10^{10} UFC del ceppo probiotico *L. rhamnosus* CA15 (DSM 33960) (Sacco System), per 10 giorni consecutivi. Il placebo consisteva in una capsula identica contenente amido di mais come excipiente. Al momento dell'arruolamento (T0), 10 giorni dopo l'inizio del trattamento (T1) e 30 giorni dopo la fine del trattamento (T2) sono stati valutati i segni e sintomi di disbiosi vaginale, attraverso la determinazione del Nugent score (8), la valutazione degli Amsel criterii (10) e del grado lattobacillare (9). In aggiunta è stata studiata la composizione del microbiota vaginale mediante la determinazione dei lattobacilli e dei principali patogeni, responsabili di disbiosi vaginali. È stata, infine, valutata la qualità di vita delle pazienti, dopo il trattamento con il probiotico, attraverso il questionario WHOQOL-BREF (10). Per l'intero periodo osservazionale non sono stati registrati eventi avversi. Lo studio è stato condotto secondo le Good Clinical Practices e in accordo con le politiche della World Medical Association (WMA) in merito ai principi etici per la ricerca medica che coinvolge soggetti umani, come affermato nella Dichiarazione di Helsinki (11).

Risultati e Discussione

Caratterizzazioni funzionali in vitro

Il ceppo CA15, oltre a soddisfare i requisiti di sicurezza (assenza di resistenza agli antimicrobici; assenza di attività emolitica, DNasica, e gelatinasica; incapacità di produrre ammine biogeniche), ha mostrato interessanti proprietà probiotiche in vitro. In particolare, il CA15 è in grado di inibire mediante differenti meccanismi di azione, un ampio spettro di patogeni, sia batteri sia miceti (*Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas monteilii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*). A tale riguardo il ceppo

ha mostrato anche capacità di inibire la formazione di biofilm da parte di specie ascritte al genere *Candida* (7). La capacità di produrre sia perossido di idrogeno (H_2O_2) sia acido lattico, potenzia l'attitudine del CA15 a contrastare la colonizzazione del distretto vaginale da parte di batteri patogeni contribuendo al mantenimento e alla ricostituzione della condizione di omeostasi del microbiota vaginale. Infatti, il perossido di idrogeno è in grado di esercitare effetto microbicida, mentre, l'acido lattico, acidificando la vagina, agisce come virucida e microbicida, oltre che come agente immunomodulatore (13). In aggiunta, il ceppo CA15 ha mostrato attività sia antinfiammatoria sia antiossidante. Con riferimento all'attività antinfiammatoria, il ceppo CA15 ha determinato la riduzione dei geni COX-2 e IL-8 nonché l'aumento del gene IL-10 in linee cellulari umane alle quali era stata indotta l'infiammazione mediante trattamento con LPS (7). Come noto, la modulazione della risposta immunitaria e infiammatoria, da parte di specifici ceppi microbici con proprietà probiotiche, li rende estremamente interessati al fine di stimolare la risposta antinfiammatoria in relazione a stimoli proinfiammatori. In merito all'attività antiossidante, il ceppo CA15 è stato in grado di inibire la perossidazione dell'acido linoleico mostrando attività antiossidante simile al noto agente antiossidante α -tocoferolo (7). L'attività antiossidante è direttamente correlata alla capacità di contrastare i radicali liberi, riducendo lo stress ossidativo coinvolto nell'insorgenza di svariate patologie. Al fine di poter esplicare l'effetto benefico per la salute all'ospite, i ceppi microbici con potenzialità probiotiche devono presentare capacità

di adesione e colonizzazione alle cellule epiteliali. Diversi meccanismi, intra- ed extracellulari, sono coinvolti nel processo di adesione batterica. In particolare, il ceppo CA15 ha presentato spiccata idrofobicità nonché capacità di produrre biofilm e aderire a linee cellulari umane sia intestinali (CaCo-2) sia vaginali (VK2/E6E7). Infine, la capacità del ceppo CA15 di sopravvivere durante il passaggio gastrointestinale (ottima sopravvivenza sia a bassi valori di pH sia in presenza di sali biliari) suggerisce la sua possibile somministrazione per via orale (7).

Studio clinico

Lo studio clinico ha evidenziato la riduzione statisticamente significativa dei segni e sintomi di disbiosi vaginale (leucorrea, bruciore, percezione soggettiva dei disturbi vaginali, presenza di eritema/edema vulvovaginale e bruciore) (Figura 1) nonché la riduzione degli Amsel criteri (presenza di clue cells, perdite vaginali, produzione di odori sgradevoli, pH vaginale maggiore di 4,5) (Figura 2) e del Nugent score (Figura 3). Tali variazioni sono state riscontrate non solo 10 giorni dopo l'inizio del trattamento (T1) bensì anche durante il periodo di washout (30 giorni dopo la fine del trattamento, T2). Nessuna variazione significativa dei segni e sintomi, sopramenzionati, è stata riscontrata nel gruppo placebo.

In merito alla composizione del microbiota vaginale, al momento dell'arruolamento (T0), tutte le pazienti, come atteso, presentavano una bassa densità cellulare di latobacilli e una buona presenza di patogeni vaginali, quali *G. vaginalis*, streptococchi, enterococchi e *Candida* spp., delineando un ecosistema microbico in disbiosi.

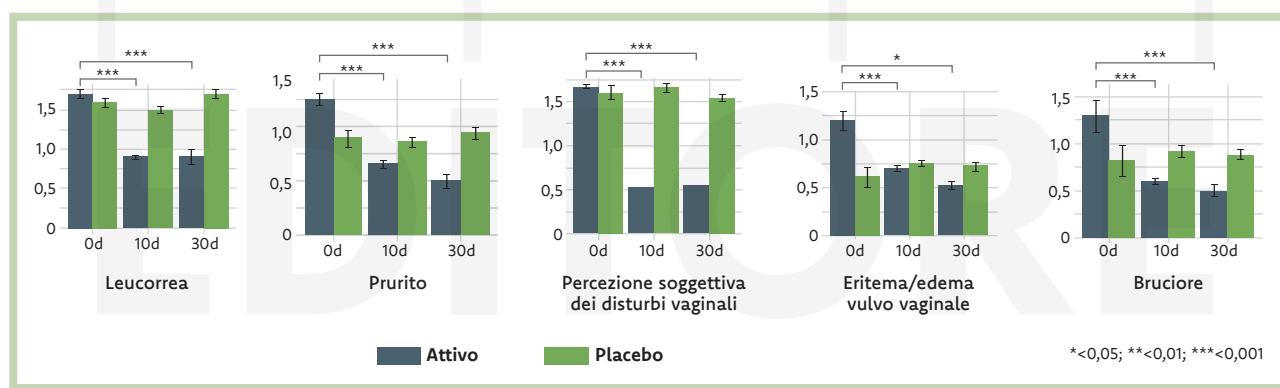


Figura 1 • Distribuzione di segni e sintomi di disbiosi vaginale nei gruppi Active e Placebo al momento dell'arruolamento (0d), 10 giorni dopo l'inizio del trattamento (10d) e 30 giorni dopo la fine del trattamento (30d).

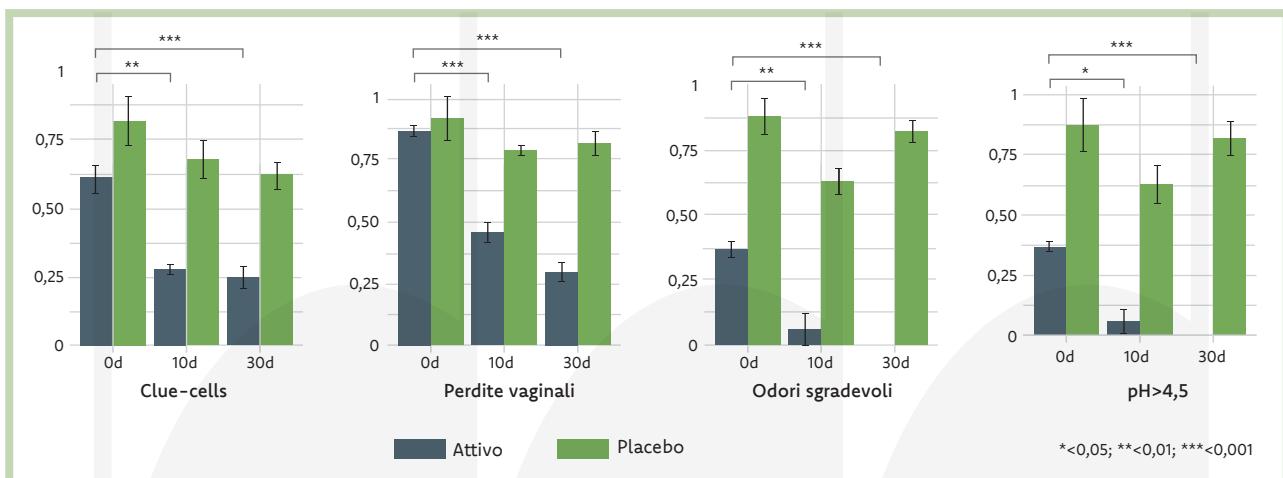


Figura 2 • Distribuzione degli Amsel criteri nei gruppi Active e Placebo al momento dell’arruolamento (0d), 10 giorni dopo l’inizio del trattamento (10d) e 30 giorni dopo la fine del trattamento (30d).

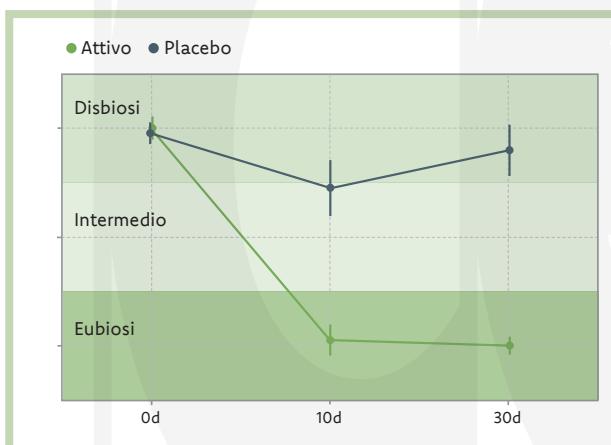


Figura 3 • Nugent score nei gruppi Active e Placebo al momento dell’arruolamento (0d), 10 giorni dopo l’inizio del trattamento (10d) e 30 giorni dopo la fine del trattamento (30d).

La somministrazione orale del ceppo CA15 per 10 giorni (T1), ha determinato una riduzione statisticamente signifi-

cativa dei microrganismi patogeni, quali *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella* spp., *Candida* ed *Escherichia coli* (**Figura 4**).

Al contrario, è stato rilevato un aumento significativo, di circa 4 unità logaritmiche, della densità di popolazione dei lattobacilli.

Trenta giorni dopo la fine del trattamento (T2), la composizione del microbiota vaginale è risultata essere abbastanza stabile suggerendo che la condizione di equilibrio, raggiunta durante il trattamento (T1), è stata mantenuta anche ben dopo 30 giorni. Questo dato evidenzia la capacità del ceppo probiotico di aderire alla mucosa vaginale e di persistere nell’ecosistema vaginale. Nessuna differenza statisticamente significativa nella composizione del microbiota vaginale è stata riscontrata nei pazienti del gruppo Placebo (**12**).

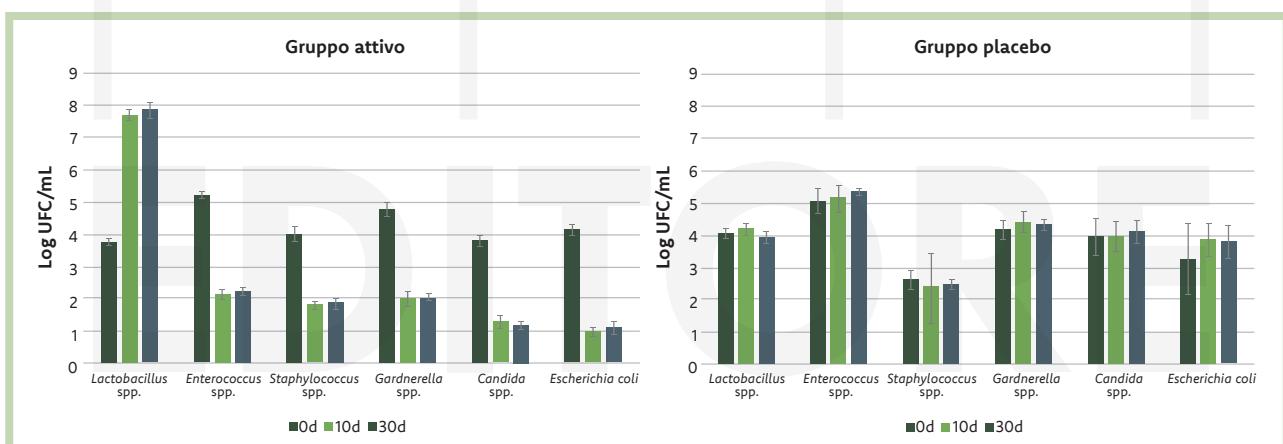


Figura 4 • Composizione del microbiota vaginale nei gruppi Active e Placebo al momento dell’arruolamento (0d), 10 giorni dopo l’inizio del trattamento (10d) e 30 giorni dopo la fine del trattamento (30d).

Dall'analisi statistica dei dati relativi al questionario sulla qualità della vita (WHOQOL-BREF) emerge chiaramente che le pazienti sottoposte a somministrazione del CA15 hanno riscontrato un miglioramento della salute fisica, delle relazioni sociali, delle relazioni sessuali e della qualità della vita complessiva. Diversamente, non sono state osservate variazioni significative nel gruppo Placebo per nessuno dei domini contemplati dal questionario (12).

I risultati sia preclinici sia clinici supportano l'idoneità del ceppo probiotico *L. rhamnosus* CA15 (DSM 33960), somministrato per via orale, nel ripristinare l'omeostasi del microbiota vaginale e, di conseguenza, ridurre significativamente i segni e i sintomi clinici, migliorando la qualità della vita delle donne in età riproduttiva. Inoltre, la persistenza del ceppo CA15 di sopravvivere nell'ecosistema vaginale ne suggerisce l'uso preventivo contro l'insorgenza di eventuali recidive.

Conclusioni

I risultati sia preclinici sia clinici supportano l'idoneità del ceppo probiotico *L. rhamnosus* CA15 (DSM 33960), somministrato per via orale, nel ripristinare l'omeostasi del microbiota vaginale e, di conseguenza, ridurre significativamente i segni e i sintomi clinici, migliorando la qualità della vita delle donne in età riproduttiva.

Bibliografia

- Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota-new player in town. Fertil Steril. 2017;108(1):32-39.
- Wang Z, He Y, Zheng Y. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis: A meta-analysis. Int J Enviro Res Public Health. 2019;16(20):3859.
- van de Wijgert JHHM, Verwijs MC. Lactobacilli-containing vaginal probiotics to cure or prevent bacterial or fungal vaginal dysbiosis: A systematic review and recommendations for future trial designs. BJOG Int J Obstet Gynaecol. 2020;127(2):287-299.
- Zhang L, Hu X, Wang Y et al. Effects of probiotic supplementation on glucose metabolism in pregnant women without diabetes: a systematic review and meta-analysis. Food Funct. 2022;13(16):8388-8398.
- Pino A, Bartolo E, Caggia C et al. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. Sci Rep. 2019;9(1):3355.
- Amabebe E, Anumba DOC. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. Front Med. 2018;13(5):181.
- Pino A, Vaccalluzzo A, Caggia C et al. Lacticaseibacillus rhamnosus CA15 (DSM 33960) as a Candidate Probiotic Strain for Human Health. Nutrients. 2022;14(22):4902.
- Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol. 1991;29(2):297-301.
- Amsel R, Totten PA, Spiegel CA et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med. 1983;74(1):14-22.
- Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2007;21(3):355-373.
- The WHOQOL group. Development of the world health organization WHOQOL-BREF quality of life assessment. Psychol Med. 1998;28(3):551-558.
- Rapisarda AMC, Pino A, Grimaldi RL et al. Lacticaseibacillus rhamnosus CA15 (DSM 33960) strain as a new driver in restoring the normal vaginal microbiota: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Front Surg. 2023;9(9):1075612.
- O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. BMC Infect Dis. 2011;19(11):200.